

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Mai 2003 (15.05.2003)

PCT

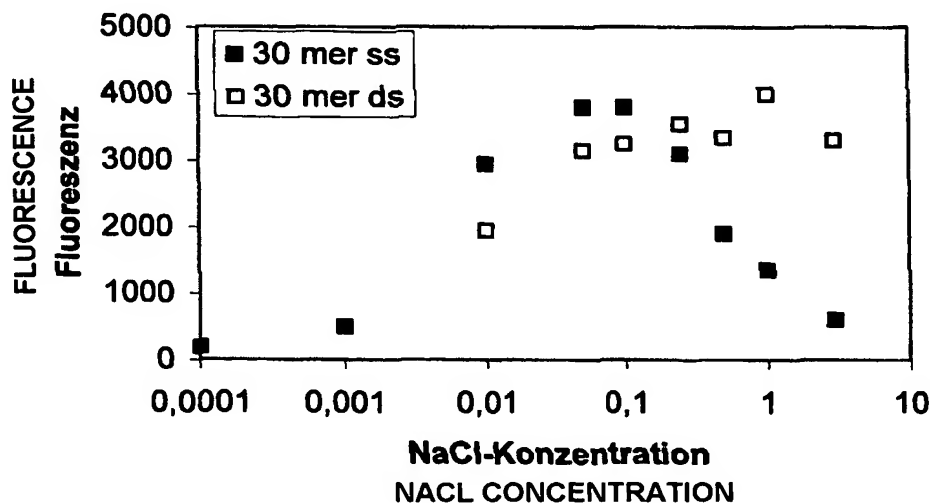
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/040680 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HARTWICH, Gerhard [DE/DE]; Nibelungenstrasse 10, 80639 München (DE). KRATZMÜLLER, Thomas [DE/DE]; Reutbergstrasse 20, 81371 München (DE). WIEDER, Herbert [DE/DE]; Partnachstrasse 3, 81373 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/04148
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. November 2002 (08.11.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: KRITZENBERGER, Jürgen; Johann-Sebastian-Bach-Strasse 5, 80637 München (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 55 055.3 9. November 2001 (09.11.2001) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, CA, CN, CU, HU, IL, IN, JP, MX, NO, PL, SI, US, ZA.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRIZ BIOCHEM GMBH [DE/DE]; Nibelungenstrasse 10, 80639 München (DE). (84) Bestimmungsstaaten (regional): eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FLUORESCENCE-QUENCHING USED TO DETECT NUCLEIC ACID OLIGOMER HYBRIDIZATION EVENTS AT HIGH SALT CONCENTRATIONS

(54) Bezeichnung: FLUORESCENZ-QUENCHEN ZUR DETEKTION VON NUKLEINSÄURE-OLIGOMER-HYBRIDISIERUNGSEREIGNISSEN BEI HOHEN SALZ-KONZENTRATIONEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting nucleic acid oligomer hybridization events by fluorescence quenching, which comprises as a first step the provision of a modified surface. The modification of the surface consists in the binding of at least one type of modified nucleic acid oligomers 201, wherein said nucleic acid oligomers 201 are modified by at least one type of fluorophore 102 bound to it. The further steps of the inventive method are: providing a sample that includes nucleic acid oligomers, contacting said sample with the modified surface, adjusting a defined salt concentration of greater than 0,5 mole/l in the solution surrounding the modified nucleic acid oligomer, detecting the fluorescence of the fluorophore and comparing the detected fluorescence intensity with reference values.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AU, BR, CA, CN, CU, HU, IL, IN, JP, MX, NO, PL, SI, ZA, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen, das als ersten Schritt das Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche umfasst. Die Modifikation der Oberfläche besteht dabei in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201), wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind. Die weiteren Schritte des erfindungsgemässen Verfahrens sind Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren, Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche, Einstellen einer definierten Salzkonzentration von grösser 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors und Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten.

Fluoreszenz-Quenchen zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen bei hohen Salz-Konzentrationen

5

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen.

10

Stand der Technik

15 In der Krankheitsdiagnose, bei toxikologischen Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem Agrar- und pharmazeutischen Sektor werden Immunoassays und zunehmend auch die Sequenzanalyse von DNA und RNA eingesetzt. Neben den bekannten seriellen Verfahren mit autoradiographischer oder optischer Detektion finden zunehmend parallele Detektionsverfahren mittels Array-Technologie, 20 sogenannten DNA- oder Protein-Chips, Verwendung. Auch bei diesen parallelen Verfahren beruht die Detektion auf optischen, radiographischen, massenspektrometrischen oder elektrochemischen Methoden.

Zur Genanalyse auf einem Chip wird auf einer Oberfläche eine Bibliothek bekannter DNA- 25 Sequenzen ("Sonden-Oligonukleotide") in einem geordneten Raster fixiert, so dass die Position jeder individuellen DNA-Sequenz bekannt ist. In der Untersuchungslösung anwesende Fragmente aktiver Gene ("Target-Oligonukleotide"), deren Sequenzen zu bestimmten Sonden-Oligonukleotiden auf dem Chip komplementär sind, können durch Nachweis der entsprechenden Hybridisierungsereignisse auf dem Chip identifiziert 30 werden. Im Allgemeinen erfolgt die Analyse über optische (oder autoradiographische) Detektionsverfahren unter Verwendung von Target-Oligonukleotiden, die mit einem Radiolabel (z.B. ^{32}P) oder einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein, Cy3TM oder Cy5TM) markiert sind. Die Verwendung von Fluoreszenzlabel und entsprechenden Fluoreszenz-Scannern überwiegt dabei zunehmend die Anwendung von Radiolabel. Die 35 zur Zeit auf dem Markt erhältlichen Fluoreszenz-Scanner ermöglichen den Nachweis von Fluorophoren im Subattomol-Bereich.

Die Verwendung von markierten Targets zum Nachweis von Hybridisierungsereignissen beinhaltet jedoch einige Nachteile. Zum einen muss die Markierung vor der eigentlichen Messung erfolgen, was einen zusätzlichen Syntheseschritt und damit zusätzlichen Arbeitsaufwand bedeutet. Zudem ist es schwierig, eine homogene Markierung des Probenmaterials zu gewährleisten. Außerdem sind stringente Waschbedingungen notwendig, um im Anschluss an eine Hybridisierung nicht oder unspezifisch gebundenes Material zu entfernen.

- 10 Sowohl für die Protein- als auch für die DNA-Analyse ist es daher wünschenswert und für den Anwender vorteilhaft, wenn die Targets (Antikörper bzw. Antigen oder DNA-Fragment) nicht mit einem Detektionslabel modifiziert werden müssten.

Die Nachteile der Markierung des Probenmaterials mit radioaktiven Elementen oder Fluoreszenzfarbstoffen können umgangen werden, wenn an Stelle der Targets die Sondenmoleküle mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Nach diesem Prinzip funktionieren die sogenannten molekularen Leuchten (molecular beacons). Diese einsträngigen Oligonukleotide weisen eine Haarnadelstruktur (hairpin, stem-and-loop) auf und tragen am einen Ende der Sequenz einen Fluorophor (z.B. Fluorescein, TexasRed®) und am anderen Ende der Sequenz einen geeigneten Fluoreszenzlöcher (z.B. DABCYL). Durch die spezielle geometrische Anordnung befinden sich die fluoreszierende Gruppe und die Einheit, die zur Löschung der Fluoreszenz führt, in räumlicher Nähe zueinander. Daher zeigen die Sonden nur eine äußerst geringe Fluoreszenz. In Gegenwart der entsprechenden zur Sequenz der Schlinge (loop) komplementären Sequenz (Target) erfolgt die Hybridisierung in diesem Bereich. Dies führt zu einer Änderung der Konformation und zur Trennung von Fluorophor und Quencher, was als starke Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden kann.

Neben organischen Molekülen (wie DABCYL) werden auch Gold-Nanopartikel als effiziente Quencher eingesetzt (vgl. Nature Biotech. Vol. 19, 2001, Seite 365). Das Quenchen der Fluoreszenz durch Metalle beruht primär auf einem strahlungslosen Energietransfer vom Farbstoffmolekül zum Metall. Bei Verwendung von Gold-Nanopartikeln wird eine größere Sensitivität beobachtet als bei organischen Quenchern. Außerdem werden Farbstoffe bis in den nahen Infrarot-Bereich effizient gequencht. Ein Nachteil dieser Methode liegt allerdings darin, dass Gold-Nanopartikel bei Temperaturen über 50°C nicht mehr stabil sind. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass diese Methode

auf die Untersuchung von Lösungen beschränkt ist und daher nur wenige Sequenzen zur gleichen Zeit untersucht werden können, der Parallelisierungsgrad dieses Ansatzes also gering ist.

- 5 Aus dem Stand der Technik sind auch Untersuchungen zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen bekannt (T. Neumann, Dissertation "Strategies for Detecting DNA Hybridisation Using Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy", Mainz, Juni 2001). Aus dieser Arbeit geht hervor, dass die Salz-Konzentration in der die Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung
- 10 einen Einfluss auf die Konformation der Nukleinsäure-Oligomere ausübt. Es wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung um einen Faktor 1,75 festgestellt, was zu einer unbefriedigenden Nachweisgrenze, insbesondere bei parallelen Verfahren, führt.
- 15 Obwohl es also viele Detektionsmöglichkeiten für Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignisse gibt, ist der Bedarf an einfachen, kostengünstigen, problemlos durchzuführenden und verlässlichen Detektionsprinzipien vor allem im Bereich der weniger dichten Array-Technologien (DNA- und Protein-Chips mit wenigen einzelnen bzw. bis zu mehreren hunderttausend Test-Sites pro cm^2 z.B. für sogenannte POC (Point of
- 20 Care)- Systeme bzw. für high throughput screening - HTS - Systeme) hoch.

Darstellung der Erfindung

- 25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden bereit zu stellen, welches die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweist.

- 30 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren gemäß unabhängigem Patentanspruch 1 und durch den Kit gemäß unabhängigem Anspruch 11 gelöst.

- Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den
- 35 Beispielen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

Genetik

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PNA	Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat-Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat-Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO\text{-}$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA.)
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z.B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z.B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z.B. auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z.B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit zur sequenzspezifischen Bindung natürlich vorkommender cDNA oder RNA.
.nt	Nukleotid
Nukleinsäure-Oligomer	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z.B.

	Nukleinsäure-Oktamer: Eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei der 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).
ns-Oligomer	Nukleinsäure-Oligomer
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z.B. ein DNA-, PNA- oder RNA-Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
Mismatch	Zur Ausbildung der Watson-Crick-Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als "Mismatch" bezeichnet.
ss	single strand (Einzelstrang)
ds	double strand (Doppelstrang)

Substanzen

Fluorophor	chemische Verbindung (chemische Substanz), die in der Lage ist, bei Anregung mit Licht ein längerwelliges (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht abzugeben. Fluorophore (Fluoreszenzfarbstoffe) können Licht in einem Wellenlängenbereich vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich absorbieren. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind in der Regel um 15 bis 40 nm verschoben (Stokes-Shift).
FP	Fluorophor
Cy3™	5,5'-disulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanin (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Amersham Life Science, Inc.)

Cy5™	5,5',7,7'-tetrasulfo-1,1'-di(-carbopentenyl)-3,3',3'-tetramethyl-benzindodicarbocyanin (Fluoreszenzfarbstoff der Firma Amersham Life Science, Inc.)
Fluorescein	Resorcinphtalein (Fluoreszenzfarbstoff)
Rhodamin 6G	Basic Red 1 (Fluoreszenzfarbstoff)
Texas Red®	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Molecular Probes, Inc.
DABCYL	4-((4'-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure
Fluoreszenzlöschung	strahlungsloser Energietransfer
Fluoreszenz-Quenchen	Fluoreszenzlöschung
Quench-Oberfläche	leitende (Metall)-Oberfläche, die durch einen Energietransfer Fluoreszenz löschen kann (insbesondere Gold-, Silber-, Kupfer-Oberflächen usw.)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)
Linker	molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Hetero-Alkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit dem entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1 - 60, insbesondere der Kettenlänge 5 - 40, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, einem Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.

Spacer	Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 - 60, insbesondere der Kettenlänge 5 - 40, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.
--------	---

Modifizierte Oberflächen/Elektroden

<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-FP</i>	Gold-Oberfläche mit kovalent aufgebracht Monolayer aus derivatisiertem Einzelstrang-Oligonukleotid. Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH ₂) ₂ -S) ₂ zum P-O-(CH ₂) ₂ -S-S-(CH ₂) ₂ -OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Am freien Ende trägt das Sonden-Oligonukleotid einen kovalent angebunden Fluorophor (FP) wie z.B. Cy3™, Cy5™, Texas Red®, Rhodamin 6G, Fluorescein etc.
<i>Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-FP</i>	<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-FP</i> hybridisiert mit dem zu ss-oligo komplementären Oligonukleotid.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen, das als ersten Schritt das
- 5 Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche umfasst. Die Modifikation der Oberfläche besteht dabei in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren, wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind. Die weiteren Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren, Inkontaktbringen der Probe
- 10 mit der modifizierten Oberfläche, Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors und Vergleich der bei der Detektion bestimmten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten.
- 15 In dem erfindungsgemäßen Verfahren ist ein Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensitäten mit Referenzwerten erforderlich. Diese Referenzwerte können aus vorangegangenen Messungen bereits vorliegen und brauchen daher im

allgemeinsten Fall nicht im Laufe des erfindungsgemäßen Verfahrens detektiert werden. Da die Referenzwerte aber im Idealfall unter exakt den gleichen äußeren Bedingungen bestimmt werden sollen wie die eigentlichen Messwerte der Fluoreszenzintensitäten, wird gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung vor dem

5 Inkontaktbringen der Targets (Probe) mit der modifizierten Oberfläche eine erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors durchgeführt. Dazu wird eine definierte Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung eingestellt, wobei dieselbe Salzkonzentration wie bei der zweiten Detektion der

10 Fluoreszenz des Fluorophors verwendet wird, dann erfolgt die erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors. Anschließend werden Stringenzbedingungen für die Hybridisierung eingestellt und die Probe mit der modifizierten Oberfläche in Kontakt gebracht. Die bei dieser ersten Fluoreszenzdetektion erhaltenen Werte werden dann als Referenzwerte verwendet und mit den bei der zweiten Fluoreszenzdetektion erhaltenen

Werten verglichen.

15 Das Einstellen der Stringenzbedingungen für die Hybridisierung und das Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche kann grundsätzlich in jeder beliebigen zeitlichen Abfolge durchgeführt werden. Bevorzugt werden die Stringenzbedingungen für die Hybridisierung gleichzeitig mit dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten

20 Oberfläche eingestellt oder das Einstellen der Stringenzbedingungen für die Hybridisierung erfolgt nach dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche.

Gemäß den nachfolgend geschilderten, besonders bevorzugten Ausführungsformen der

25 vorliegenden Erfindung wird zusätzlich eine Normierungsmessung durchgeführt. Auf der modifizierten Oberfläche sind in diesen Fällen Sites aufgebracht, denen nach Zugabe der Probe ein ganz bestimmter Assoziationsgrad zugeordnet werden kann. Das bei der Detektion erhaltene Signal ist dann für diesen bestimmten Grad an Assoziation charakteristisch und kann zur Normierung der Signale der Test-Sites herangezogen

30 werden.

Die vorliegende Erfindung umfasst nämlich auch Verfahren, in denen eine modifizierte Oberfläche verwendet wird, die durch Anbindung von wenigstens zwei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren modifiziert wurde. Die verschiedenen Arten von

35 modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren sind in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden. Unter "im wesentlichen abgetrennten Bereichen"

werden Bereiche der Oberfläche verstanden, die ganz überwiegend durch Anbindung einer bestimmten Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren modifiziert sind. Lediglich in Gebieten, in denen zwei solche im wesentlichen abgetrennte Bereiche aneinander grenzen, kann es zu einer räumlichen Vermischung von verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren kommen. In dem im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugten Verfahren erfolgt vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche der Zusatz von einem Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei das Nukleinsäure-Oligomer ein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante zu einer bestimmten Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren ist, die in einem bestimmten Bereich (Site T_{100}) an die Oberfläche gebunden vorliegt. Das Nukleinsäure-Oligomer wird dabei in einer Menge zu der Probe zugegeben, die größer ist als die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die notwendig ist, um die modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren der T_{100} -Sites vollständig zu assoziieren. Den letzten Schritt dieses Verfahrens bildet der Vergleich der bei der Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors erhaltenen Werte mit dem für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert. Der für den Bereich T_{100} erhaltene Wert entspricht somit dem Wert bei vollständiger Assoziation (100%).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine modifizierte Oberfläche verwendet, die durch Anbindung von wenigstens drei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren modifiziert wurde. Die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren sind in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden. Dabei ist wenigstens eine Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomer in einem bestimmten Bereich (Site T_0) an die Oberfläche gebunden, von dem bekannt ist, dass in der Probe kein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante enthalten ist, also das entsprechende Nukleinsäure-Oligomer nicht in der Probe vorkommt. Auch in diesem besonders bevorzugten Verfahren erfolgt vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche der Zusatz von einem Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei das Nukleinsäure-Oligomer ein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante zu einer bestimmten Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren ist, die in einem bestimmten Bereich (Site T_{100}) an die Oberfläche gebunden vorliegt. Das Nukleinsäure-Oligomer wird dabei in einer Menge zu der Probe zugegeben, die größer ist als die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die notwendig ist, um die modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren der T_{100} -Sites vollständig zu assoziieren. Den letzten Schritt dieses Verfahrens bildet der Vergleich der bei der Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors erhaltenen Werte mit dem für den Bereich

T_{100} erhaltenen Wert und mit dem für den Bereich T_0 erhaltenen Wert. Der für den Bereich T_0 erhaltene Wert entspricht somit dem Wert bei fehlender Assoziation (0%).

Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der oben geschilderten
5 Verfahren erfolgt vor dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche der
Zusatz von wenigstens einer weiteren Art von Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei
bekannt ist, dass dieses Nukleinsäure-Oligomer in der ursprünglichen Probe nicht
enthalten ist. Diese weitere Art von Nukleinsäure-Oligomer weist eine
Assoziationskonstante >0 zu einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren auf, die
10 in einem bestimmten Bereich (Site T_n) an die Oberfläche gebunden vorliegt. Das
Nukleinsäure-Oligomer wird in einer solchen Menge zu der Probe gegeben, dass nach
dem Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche $n\%$ der modifizierten
Nukleinsäure-Oligomere des Sites T_n in assoziierter Form vorliegen. Den letzten Schritt
dieses Verfahrens bildet der Vergleich der bei der Detektion der Fluoreszenz des
15 Fluorophors erhaltenen Werte mit dem für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert, mit dem für
den Bereich T_0 erhaltenen Wert und mit den für die Bereiche T_n erhaltenen Werten. Der
für ein bestimmtes Test-Site T_n erhaltene Wert entspricht somit dem Wert bei Vorliegen
von $n\%$ Assoziaten aus modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren und Target-Nukleinsäure-
Oligomeren bezogen auf die Gesamtzahl an modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren der
20 entsprechend Art.

Die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die mit der modifizierten Oberfläche in Kontakt
gebracht werden muss, um eine $n\%$ ige Assoziation am Site T_n zu bewirken, kann vom
Fachmann durch einfache Routineuntersuchungen bestimmt werden. Dazu wird z.B. nach
25 Detektion der Werte für T_0 und T_{100} eine kalibrierte Messung durchgeführt, bei der die
Signalintensität von (unterschiedlichen) Detektionslabel bestimmt wird, mit denen die
modifizierten Nukleinsäure-Oligomere und die Target-Nukleinsäure-Oligomere
ausgestattet sind. Das Verhältnis der Intensitäten von Target-Nukleinsäure-Oligomer-
Label-Signal zu modifiziertem Nukleinsäure-Oligomer -Label-Signal entspricht $n\%$.

30

Wird eine genügende Anzahl an Sites T_n auf der modifizierten Oberfläche aufgebracht, so
kann eine Normierungskurve mit hoher Genauigkeit aufgenommen werden. Die
Normierung der Messungen der eigentlichen Test-Sites mit Hilfe dieser Normierungskurve
verbessert die Reproduzierbarkeit der Analytik mit Hilfe der Chip-Technologie deutlich.

35

Es soll darauf hingewiesen werden, dass das Auffinden eines Nukleinsäure-Oligomers, das nicht in der Probe enthalten ist, keinerlei Probleme bereitet, da auch die umfangreichsten Genome immer noch eine genügende Auswahl an nicht vorhandenen Sequenzen bieten. Für den Fall, dass sich die nicht vorhandene Sequenz von einer anwesenden Sequenz nur durch eine Base unterscheidet, muss der Hybridisierungsschritt unter stringenten Bedingungen durchgeführt werden. Bevorzugt werden aber Sequenzen verwendet, die sich deutlich, also in mehreren Basen, von den in der Probe anwesenden Sequenzen unterscheiden. Besonders gute Ergebnisse werden erzielt, wenn für die Test-Sites und für die Normierungssites Oligonukleotide mit der gleichen oder zumindest einer ähnlichen Zahl an Basen verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem einen Kit, der eine modifizierte Oberfläche umfasst, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind.

Erfindungsgemäß wird die Detektion der Fluoreszenz nach Einstellen einer definierten Salzkonzentration von größer 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung durchgeführt. Bevorzugte Salzkonzentrationen liegen in den Bereichen zwischen 0,5 und 10 mol/l, zwischen 1 und 10 mol/l, zwischen 0,5 und 3 mol/l und insbesondere zwischen 2 und 3 mol/l, weil in diesen Bereichen gefunden wurde, dass eine besonders große Differenz in der Fluoreszenzintensität zwischen dem hybridisierten und dem nicht-hybridisierten Nukleinsäure-Oligomer besteht. Dadurch wird eine besonders sichere Detektion der Hybridisierungsereignisse ermöglicht.

Die Quench-Oberfläche

Mit dem Begriff "Oberfläche" wird jedes Trägermaterial bezeichnet, das geeignet ist, direkt oder nach entsprechender chemischer Modifizierung Fluorophor-derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere zu tragen, die kovalent an der Oberfläche immobilisiert sind und deren Fluoreszenz nahe an der Oberfläche (in ca. 1 bis 50 Å Abstand zur Oberfläche) durch Fluoreszenzlöschung (strahlungsloser Energietransfer zwischen dem Fluorophor als Emitter und der Oberfläche als Absorber) signifikant (>10% der erwarteten Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit der Oberfläche bei ansonsten gleichen Bedingungen) reduziert wird. Insbesondere sind Gold und Silber als Quench-

Oberflächenmaterial geeignet. Die Bezeichnung Oberfläche ist unabhängig von den räumlichen Dimensionen der Oberfläche und beinhaltet auch Nanopartikel (Partikel oder Cluster aus wenigen einzelnen bis mehreren hunderttausend Oberflächen-Atomen oder -Molekülen). Die Oberfläche kann zusätzlich an einen festen Träger wie z.B. Glas, Metall oder Plastik gebunden vorliegen.

Bindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche

Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäure-Oligomeren an einer Oberfläche sind dem Fachmann bekannt. Die Immobilisierung kann z.B. kovalent über Amino-, Hydroxyl-, Epoxid- oder Carboxygruppen des Trägermaterials mit natürlicherweise am Nukleinsäure-Oligomer vorhandenen oder durch Derivatisierung am Nukleinsäure-Oligomer angebrachten Thiol-, Hydroxy-, Amino- oder Carboxylgruppen erfolgen. Das Nukleinsäure-Oligomer kann direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer Oberfläche verbunden werden. Daneben kann das Nukleinsäure-Oligomer durch die bei Immunoassays üblichen Methoden verankert werden wie z.B. durch Verwendung von biotinylierten Nukleinsäure-Oligomeren zur nicht-kovalenten Immobilisierung an Avidin oder Streptavidin-modifizierten Oberflächen. Die chemische Modifikation der Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren mit einer Oberflächen-Ankergruppe kann bereits im Verlauf der automatisierten Festphasensynthese oder aber in gesonderten Reaktionsschritten eingeführt werden. Dabei wird auch das Nukleinsäure-Oligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer Oberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann auf verschiedene, aus dem Stand der Technik bekannten Arten durchgeführt werden (vgl. z.B. Hartwich, G.: ELEKTROCHEMISCHE DETEKTION VON SEQUENZSPEZIFISCHEN NUKLEINSÄUREOLIGOMERHYBRIDISIERUNGSEREIGNISSEN (1999), WO 00/42217).

Bei der Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberflächen ist auf einen besonders wichtigen Punkt zu achten. Grundsätzlich herrschen zur Detektion der Differenz der Fluoreszenzintensität von hybridisierten Nukleinsäure-Oligomeren und einsträngigen Nukleinsäure-Oligomeren dann besonders günstige Bedingungen, wenn der Fluorophor sich in nur einem der Zustände "hybridisiert" oder "nicht hybridisiert" möglichst nahe an der modifizierten Oberfläche befindet. Das Ausmaß des Quench-Vorgangs verändert sich ja bekanntermaßen mit einer höheren (dritte bis sechste) Potenz des Abstandes zwischen Quench-Oberfläche und Fluorophor. Solche besonders

günstigen Bedingungen können nur mit speziellen Anbindungstechniken erreicht werden. Es muss bei der Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere darauf geachtet werden, dass diese entweder völlig ohne weiteres Co-Adsorbat an die Oberfläche gebunden werden oder, falls ein Co-Adsorbat notwendig erscheint, dass dieses eine möglichst dünne Schicht über der Oberfläche ausbildet. Es muss also entweder eine direkte Anbindung des Nukleinsäure-Oligomers an die Oberfläche erfolgen oder eine Belegung zusammen mit möglichst kurzkettigen Co-Adsorbaten wie z.B. kurzkettigen Thiolen. Bevorzugt werden Co-Adsorbate der Kettenlänge 1 bis 30, bevorzugt 1 bis 20, besonders bevorzugt 1 bis 10, insbesondere bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 5.

10

Insbesondere nachteilig ist in diesem Zusammenhang eine Anbindung der Nukleinsäure-Oligomere in Form einer Verbindung Oberfläche-Biotin-Avidin-Biotin-Oligomer. Bei einer solchen Anbindung ist der Fluorophor immer durch eine sehr dicke Schicht aus Biotin-Avidin-Biotin von der Oberfläche abgeschirmt, was mit entsprechenden Nachteilen in der Detektion der Fluoreszenz einhergeht.

15

Fluorophore

Als Fluorophore werden kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Texas Red®, Rhodamin-Farbstoffe, Cyaninfarbstoffe wie z.B. Cy3™, Cy5™, Fluorescein etc (vgl. Fluka, Amersham und Molecular Probes Katalog) verwendet.

25 Fluoreszenzlöschung

Mit Fluoreszenzlöschung wird die Deaktivierung einer elektronisch angeregten Spezies über einen strahlungslosen Prozess bezeichnet. Die Deaktivierung kann durch Stöße oder auch durch strahlungslose Energieübertragung auf Metalle erfolgen. Die freiwerdende Energie wird als thermische Energie dissipiert. Gold ist ein Beispiel für ein Metall, das die Fähigkeit zur Fluoreszenzlöschung besitzt. Die Löschung weist eine starke Abhängigkeit vom Abstand des Fluorophors von der als Fluoreszenzlöcher fungierenden Oberfläche auf (umgekehrt proportional zu einer höheren (dritte bis sechste) Potenz des Abstands). Der Effekt der Fluoreszenzlöschung ist daher nur bei Abständen kleiner 100 bis 200 Å messbar. Im Bereich größer als ca. 200 Å führen weitere Abstandsänderungen nicht mehr zu einer messbaren Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

35

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

5

Fig. 1 eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen;

Fig. 2 A: Messung der Fluoreszenz-Intensitätsänderung einer 20mer und einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde (einsträngig) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche;

B: Messung der Fluoreszenz-Intensitätsänderung vor und nach der sequenzspezifischen Hybridisierung einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde mit dem komplementären Gegenstrang (Target) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche.

Bezugszeichenliste

10

102: Fluorophor

201: einsträngige Oligomer-Sonde

202: Sonde hybridisiert mit Target

203: Oberfläche (z.B. Gold)

15

204: Abstand des Fluorophor zur Goldoberfläche vor der Hybridisierung

205: Abstand des Fluorophor zur Goldoberfläche nach der Hybridisierung

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung der Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Modulation der Fluoreszenzlöschung an Quench-Oberflächen. In Figur 1A ist der Fall dargestellt, dass das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 vor der Hybridisierung in einer Form vorliegt, die durch einen großen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quencher Metalloberfläche charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verringert sich der Abstand 205 zwischen dem

fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität (Balkendiagramm der Figur 1A). Figur 1B zeigt den Fall, dass das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 vor der Hybridisierung in einer Form vorliegt, die durch einen geringen Abstand 204 von Fluorophor 102 und quenchender Metalloberfläche 203 charakterisiert ist. Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) vergrößert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Balkendiagramm der Figur 1B).

Figur 2A zeigt eine Auftragung der Fluoreszenz-Intensitäten einer 20mer und einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde (einsträngig) in Abhängigkeit von der Ionenstärke (hier Salzkonzentration) der Lösung über der Oberfläche. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität von 200 µm-Spots von auf einer 1 cm² großen Gold-Platte immobilisierten Einzelstrang-Sondenoligonukleotiden (20 mer und 30 mer) mit Cy3TM als kovalent angebundenem Fluorophor. Die Auftragung gemäß Figur 2B zeigt die Fluoreszenz-Intensität vor und nach der sequenzspezifischen Hybridisierung einer 30mer-Nukleinsäure-Sonde mit dem komplementären Gegenstrang (Target) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Lösung über der Oberfläche unter ansonsten gleichen Bedingungen wie in Zusammenhang mit Figur 2A beschrieben. Aus der Figur 2B geht deutlich hervor, dass sich bei Salzkonzentrationen von mehr als 0,5 mol/l die Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung um bis zu einem Faktor 5 erhöht. Dies erlaubt auch bei parallelen Verfahren eine eindeutige Detektion der erfolgten Hybridisierungen.

Wege zur Ausführung der Erfindung

Um die Vorteile der DNA-Chip-Technologie auf die Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden durch Modulation des Fluoreszenzquenchens anzuwenden, werden verschiedene modifizierte Nukleinsäure-Oligomer-Sonden unterschiedlicher Sequenz mit den oben beschriebenen Immobilisierungstechniken an einen Träger gebunden. Mit der Anordnung der Nukleinsäure-Oligomer-Sonden bekannter Sequenz an jeder Position der Oberfläche, einem DNA-Array, soll das Hybridisierungsereignis eines beliebigen Target-

Nukleinsäure-Oligomern oder einer (fragmentierten) Target-DNA detektiert werden, um z.B. Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen. Dazu werden auf einer Oberfläche die Oberflächenatome oder -moleküle eines definierten Bereichs (einer Test-Site) mit DNA-/RNA-/PNA-Nukleinsäure-Oligomeren bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. In einer allgemeinsten Ausführungsform kann der DNA-Chip auch mit einem einzigen Sonden-Oligonukleotid derivatisiert werden. Als Sonden-Nukleinsäure-Oligomere werden Nukleinsäure-Oligomere (z.B. DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 70, bevorzugt der Länge 5 bis 60, besonders bevorzugt der Länge 10 bis 50, insbesondere bevorzugt der Länge 12 bis 40 verwendet.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Target-Oligonukleotide auch eine größere Anzahl an Basen umfassen können, also länger sein können, als die Sonden-Oligonukleotide. In diesem Fall wird unter dem Ausdruck "zum Sonden-Oligonukleotid komplementäres Nukleinsäure-Oligomer" ein Nukleinsäure-Oligomer verstanden, das eine Basensequenz aufweist, die in einem Teilbereich zu dem Sonden-Oligonukleotid komplementär ist. Der/die restlichen Abschnitte des Nukleinsäure-Oligomers ragen dann an dem/den Enden des Sonden-Oligonukleotids über dessen Basenkette hinaus.

An den so bereitgestellten Oberflächen mit immobilisierten und Fluorophor-markierten Sonden-Oligonukleotiden wird in einer Referenzmessung, z.B. mit einem Fluoreszenz-Scanner, die Fluoreszenzintensität der Fluorophor-markierten Sonden-Oligonukleotide im einsträngigen Zustand bei einer definierten, zuvor eingestellten Salzkonzentration in der umgebenden Lösung bestimmt.

Im nächsten Schritt wird die (möglichst konzentrierte) Untersuchungslösung mit Target-Oligonukleotid(en) unter für die Hybridisierung stringenten Bedingungen zur Oberfläche mit immobilisierten Sonden-Oligonukleotiden gegeben. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, in dem die Lösung Target-Nukleinsäure-Oligomer-Stränge enthält, die zu den an die Oberfläche gebundenen Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind.

Nach der Hybridisierung zwischen Sonde und Target wird wiederum eine definierte Salzkonzentration eingestellt und dann in einer zweiten Fluoreszenzmessung die Fluoreszenzintensität im hybridisierten, doppelsträngigen Zustand bestimmt.

Die Differenz aus Referenzmessung und zweiter Messung je Test-Site ist proportional zur Anzahl der ursprünglich in der Untersuchungslösung für das jeweilige Test-Site vorhandenen komplementären (bzw. in weiten Bereichen komplementären) Target-Oligonukleotide.

5

Gemäß einem alternativen Verfahren kann die Referenzmessung weggelassen werden, wenn die Größe des Referenzsignals vorher (z.B. durch vorausgegangene Messungen etc.) hinlänglich genau bekannt ist.

- 10 Aufgrund der Hybridisierung von Sonden-Nukleinsäure-Oligomer und dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang (Target) verändert sich der Abstand zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche. Aufgrund des veränderten Abstandes erfährt auch das Ausmaß des Quench-Vorgangs und damit die Intensität der Fluoreszenz eine starke Änderung. Somit
- 15 kann ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch fluoreszenzbasierte Verfahren wie z.B. Fluoreszenzmikroskopie oder Messungen mit Fluoreszenz-Scanner detektiert werden.

- 20 Durch eine gezielte Beeinflussung des Salzgehalts der Lösung lassen sich für das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer verschiedene räumliche Anordnungen realisieren:

a) Vor der Hybridisierung liegt das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen großen Abstand 204 von Fluorophor 102 und

25 quenchender Metalloberfläche 203 charakterisiert ist (hohe Fluoreszenzintensität). Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang 202 (Target) verändert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül 102 und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203 dahingehend, dass es durch die Verringerung des Abstands zu einer Vermehrung des Quenchens kommt und

30 eine geringere Intensität der Fluoreszenz nach der Hybridisierung beobachtet werden kann (siehe Figur 1A).

b) Vor der Hybridisierung liegt das einsträngige Sonden-Nukleinsäure-Oligomer 201 in einer Form vor, die durch einen geringen Abstand 204 von Fluorophor 102 und

35 quenchender Metalloberfläche 203 charakterisiert ist (geringe Fluoreszenzintensität). Durch die Hybridisierung mit dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang

202 (Target) verändert sich der Abstand 205 zwischen dem fluoreszierenden Farbstoffmolekül 102 und der als Quencher fungierenden Metalloberfläche 203 dahingehend, dass es durch die Vergrößerung des Abstands zu einer Verringerung des Quenchens kommt und eine höhere Intensität der Fluoreszenz nach der Hybridisierung
5 beobachtet werden kann (siehe Figur 1B).

Die beiden oben dargestellten geometrischen Anordnungen können durch die Variation der Ionenstärke, insbesondere der Salzkonzentration erreicht werden. Dabei können beliebige Salze verwendet werden mit Ausnahme von bivalenten Salzen (z.B. Mg^{2+}) oder
10 chaotropen Salzen. Bei niedrigem bis mittlerem Salzgehalt liegt die oberflächengebundene einsträngige Sonde in einer eher gestreckten Konformation vor (siehe Figur 1A). Durch die Hybridisierung wird eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe Figur 1A, 2B). Bei hohem Salzgehalt liegt die oberflächengebundene einsträngige Sonde in einer eher komprimierten Konformation vor (siehe Figur 1B). Durch
15 die Hybridisierung wird eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (siehe Figur 1B, 2B).

20

Ausführungsformen

Die n Nukleotide (nt) lange Nukleinsäure-Sonde (DNA, RNA oder PNA, z.B. ein 20 Nukleotide langes Oligo) ist in der Nähe eines ihrer Enden (3'- oder 5'-Ende) direkt oder über einen (beliebigen) Spacer mit einer reaktiven Gruppe zur kovalenten Verankerung an
25 der Oberfläche versehen, z.B. als 3'-Thiol-modifiziertes Sonden-Oligonukleotid, bei dem die endständige Thiolmodifikation als reaktive Gruppe zur Anbindung an Gold dient. Weitere kovalente Verankerungsmöglichkeiten ergeben sich z.B. aus aminmodifiziertem Oligonukleotid, das zur Verankerung an oberflächlich gebundene Carbonsäurefunktionen (z.B. über säurefunktionalisierte Thiole wie Mercaptopropionsäure und eine Aktivierung
30 z.B. als Aktivester) verwendet wird. In der Nähe des anderen Terminus des Sondenoligonukleotids ist ein Fluorophor kovalent angebunden (vgl. Beispiel 1). Die so modifizierte Nukleinsäure-Sonde wird

- (i) in Puffer (z.B. 10 - 500 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA) gelöst mit
35 der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des

Sonden-Nukleinsäureoligomers an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden oder

(ii) in Gegenwart eines monofunktionalen Linkers in Puffer (z.B. 100 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA, 0,1 - 1 M NaCl) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers gemeinsam mit dem monofunktionalen Linker an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden, wobei darauf geachtet wird, dass genügend monofunktionaler Linker geeigneter Kettenlänge zugesetzt wird (etwa 0.1 bis 10 facher Überschuss), um zwischen den einzelnen Sonden-Oligonukleotiden genügend Freiraum für eine Hybridisierung mit den Target-Oligonukleotid zur Verfügung zu stellen oder

(iii) in Puffer (z.B. 10 - 350 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, 1mM EDTA) gelöst mit der Oberfläche in Kontakt gebracht und dort über die reaktive Gruppe des Sonden-Nukleinsäureoligomers an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche angebunden. Anschließend wird die so modifizierte Oberfläche mit dem entsprechenden monofunktionalen Linker in Lösung (z.B. Alkanthiole oder ω -Hydroxy-Alkanthiole in Phosphat-Puffer/EtOH-Mischungen bei Thiol-modifizierten Sondenoligonukleotiden) in Kontakt gebracht, wobei der monofunktionale Linker über seine reaktive Gruppe an die - gegebenenfalls entsprechend derivatisierte - Oberfläche anbindet (vgl. Abschnitt "Bindung der Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche").

Die (Rest-) Fluoreszenz des Fluorophors am Sonden-Oligonukleotid wird durch ein geeignetes Verfahren detektiert, z.B. durch Fluoreszenzmessung mit einem Fluoreszenz-Scanner in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen (vgl. Beispiel 7). Die Fluoreszenzintensität des einsträngigen Sonden-Oligonukleotids zeigt ein Maximum bei einer Salzkonzentration zwischen 0,05 und 0,25 mol/l (siehe Figur 2A). Anschließend wird das gelöste Target zugegeben, potentielle Hybridisierungsereignisse werden unter geeigneten, dem Fachmann bekannten Bedingungen ermöglicht (beliebige, frei wählbare Stringenzbedingungen der Parameter Potential/Temperatur/Salz/chaotrope Salze etc. für die Hybridisierung) und die Messung zur Detektion des Fluorophors bei einer der Salzkonzentration der ersten Detektion entsprechenden Salzkonzentration wiederholt.

Der Unterschied im Messsignal (Ab- bzw. Zunahme, je nach Salzkonzentration, vgl. Fig. 1) ist proportional zur Anzahl der Hybridisierungsereignisse zwischen Sonden-Nukleinsäureoligomer auf der Oberfläche und passendem Target-Nukleinsäure-Oligomer in der Untersuchungslösung (vgl. Bsp. 8).

5

Das beschriebene Verfahren kann für eine Targetart (z.B. eine bestimmte Targetoligonukleotid-Art mit bekannter Sequenz) an einer Oberfläche oder - bei Verwendung jeweils verschiedener Sonden-Arten für jedes Test-Site - für mehrere Target-Arten (mehrere verschiedene Target-Oligonukleotid-Arten) angewendet werden.

10

Beispiel 1

Darstellung der aminomodifizierten Oligonukleotide zur Verankerung auf modifizierten Goldoberflächen als Sondenoligonukleotide

15

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 M Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Der Amino-Modifier C2 dT (Glen Research 10-1037) wird in die Sequenzen mit den jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

20

25

Die Oligonukleotide werden mit konzentriertem Ammoniak (30%) bei 37 °C 16 h entschützt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels RP-HPL Chromatographie nach Standardprotokollen (Laufmittel: 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer, Acetonitril), die Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS. Die aminomodifizierten Oligonukleotide werden an die entsprechend aktivierten Fluorophore (z.B. Fluoresceinisothiocyanat) gemäß dem Fachmann bekannten Bedingungen gekoppelt. Die Kopplung kann sowohl vor als auch nach der Anbindung der Oligonukleotide an die Oberfläche erfolgen.

30

35

Beispiel 2

Darstellung der fluorophormodifizierten Oligonukleotide zur Verankerung auf modifizierten Goldoberflächen als Sondenoligonukleotide

5

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese. Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 M Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Die Fluorophore werden am Synthesizer beim letzten Kopplungsschritt als Phosphoramidite (Glen Research 10-1037) in die Sequenzen mit dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.

20

Beispiel 3

Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-FP

25

Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist der Fluorescein-Modifizierer Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) in 5x10⁻⁵ molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) mit Zusatz von ca. 10⁻⁵ bis 10⁻¹ molarem Propanthiol (oder anderen Thiolen oder Disulfiden geeigneter Kettenlänge) 0,5 - 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie Propanthiol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt). Statt des Einzelstrang-

35

Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

5 **Beispiel 4**

Alternative Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-FP

Die alternative Herstellung von Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-FP gliedert sich in 2 Teilabschnitte, nämlich der Derivatisierung der Gold-Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid (Inkubationsschritt) und der Nachbelegung der so modifizierten Elektrode mit einem geeigneten bifunktionalen Linker (Nachbelegungsschritt).

Die Quench-Oberfläche (hier: Gold-Plättchen) wird mit doppelt modifiziertem 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation 1: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert; Modifikation 2: an das 5' Ende ist Fluorescein-Modifizier Fluorescein-Phosphoramidite (Proligo Biochemie GmbH) nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) in 5x10⁻⁵ molarer Pufferlösung (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) 0,5 - 24 h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Anschließend wird die so modifizierte Gold-Oberfläche mit einer ca. 10⁻⁵ bis 10⁻¹ molaren Lösung von kurzkettigen Alkanthiolen wie z.B. Propanthiol (in Wasser oder Puffer, pH 7 - 7.5 oder in Ethanol) komplett benetzt und 0,5 - 24 h inkubiert. Das freie Thiol belegt die nach dem Inkubationsschritt verbleibende freie Gold-Oberfläche durch Ausbildung einer Au-S Bindung. Alternativ können auch andere funktionale Thiole oder Disulfide geeigneter Kettenlänge mit den gleichen oder anderen funktionellen Gruppen verwendet werden.

Beispiel 5

Fluoreszenz-Intensitätsmessungen am System Au-ss-oligo-Fluorescein bzw. am System Au-ds-oligo-Fluorescein in Gegenwart von flüssigen Medien

5

Die Sonden-Oberfläche wird analog zu Bsp. 4 hergestellt. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [C₃-S-S-C₃-OH] auf Gold immobilisiert (50 µmol Oligonukleotid in Phosphat-Puffer (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 500 mM, pH 7, Nachbelegung mit Propanthiol 1 mM in Wasser) und in der Form *Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-Fluorescein* die Fluoreszenzintensität der Oberfläche mit einem Fluoreszenz-Scanner der Firma Lavision Biotech in Gegenwart von verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt. Zur Messung der Fluoreszenz in Gegenwart von flüssigen Medien werden 150 µl des Mediums auf die Goldoberfläche gegeben und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Alternativ können auch Hybriwells oder Imaging Chambers verwendet werden.

Beispiel 6

20 *Modulation des Abstands über die Ionenstärke/Salzkonzentration*

Die Sonden-Oberfläche wird analog zu Beispiel 4 hergestellt und analog Beispiel 5 vermessen. Durch Variation der Salzkonzentration (NaCl-Konzentration) in einem Bereich zwischen 1×10^{-4} und 3 Mol/Liter wird die geometrische Anordnung der einsträngigen Sonde moduliert. Die durch die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erhaltenen Werte sind in der Figur 2A dargestellt. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,5 Mol/Liter, besonders aber im Bereich zwischen 0,05 und 0,25 Mol/Liter ist die Fluoreszenzintensität am höchsten, d. h. der Fluorophor hat den größten Abstand zur Goldoberfläche.

30

Beispiel 7

35 *Fluoreszenzmessung am System Au-ss-oligo/Farbstoff-modifizierte Nukleinsäure-Oligomere in Abwesenheit und in Gegenwart von Target-Oligonukleotid (komplementär zu ss-oligo in Au-ss-oligo)*

- Gemäß Bsp. 4 wird eine Sonden-Elektrode hergestellt. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [C_3 -S-S- C_3 -OH] auf Gold immobilisiert (50 μ mol Oligonukleotid in Phosphat-Puffer (K₂HPO₄/KH₂PO₄ 500 mM, pH 7). Anschließend werden analog zu Beispiel 6 in Gegenwart von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen Fluoreszenzmessungen mit einem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Nach Hybridisierung mit komplementären Oligomeren in Phosphat-Puffer (500 mM, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) werden gemäß Beispiel 6 in Gegenwart von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen Fluoreszenzmessungen mit einem Fluoreszenz-Scanner durchgeführt. Die durch die Messung der Fluoreszenzintensität für den hybridisierten und den nichthybridisierten Fall in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erhaltenen Werte sind in der Figur 2B dargestellt.
- Im Bereich oberhalb einer Salzkonzentration von 0,5 Mol/Liter ist die Fluoreszenz nach der Hybridisierung deutlich höher als vor der Hybridisierung. Dieses Ergebnis überrascht, da die Fluoreszenz des Einzelstrangs in einem Bereich zwischen 0,05 und 0,25 mol/l Salzkonzentration ein Maximum aufweist. Die deutlichste Differenz der Fluoreszenzintensität vor bzw. nach Hybridisierung zeigt sich jedoch in einem Bereich der Salzkonzentration, in dem die Fluoreszenz des Einzelstrangs deutlich abnimmt (Figur 2B).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen umfassend die Schritte
- a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind,
- b) Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren,
- c) Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche,
- d) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, wobei eine Salzkonzentration größer 0,5 mol/l eingestellt wird,
- e) Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102),
- f) Vergleich der in Schritt e) detektierten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach Schritt a) und vor Schritt c) die Schritte
- b₃) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, wobei dieselbe Salzkonzentration wie in Schritt d) verwendet wird und
- b₄) erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102)
- durchgeführt werden und als Schritt c) der Schritt
- c) Einstellen von Stringenzbedingungen für die Hybridisierung und Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche
- durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2, wobei als Schritt a) der Schritt

a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung von wenigstens zwei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201) besteht und die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201) in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden sind und wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind,

durchgeführt wird und vor Schritt c) die Schritte

b₁) Zusatz von einer Art von Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei die Art von Nukleinsäure-Oligomer ein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante einer in einem bestimmten Bereich T_{100} an die Oberfläche gebundenen Art von modifiziertem Nukleinsäure-Oligomer (201) ist, wobei das Nukleinsäure-Oligomer in einer Menge zugegeben wird, die größer ist als die Menge an Nukleinsäure-Oligomeren, die notwendig ist, um die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere (201) der T_{100} -Sites vollständig zu assoziieren,

b₃) Einstellen einer definierten Salzkonzentration in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, wobei dieselbe Salzkonzentration wie in Schritt d) verwendet wird,

b₄) erste Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors (102) und

durchgeführt werden und als Schritt c) der Schritt

c) Einstellen von Stringenzbedingungen für die Hybridisierung und Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche

durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert und den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei als Schritt a) der Schritt

5 a) Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung von wenigstens drei Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201) besteht und die verschiedenen Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in räumlich im wesentlichen abgetrennten Bereichen an die Oberfläche gebunden sind, wobei wenigstens eine Art von modifiziertem Nukleinsäure-Oligomer (201) in einem bestimmten Bereich T_0 an die Oberfläche angebonden ist, und wobei in der Probe kein Bindungspartner mit hoher Assoziationskonstante zu diesem modifizierten Nukleinsäure-Oligomer enthalten ist und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind,

15 durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert, mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_0 erhaltenen Wert und mit den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

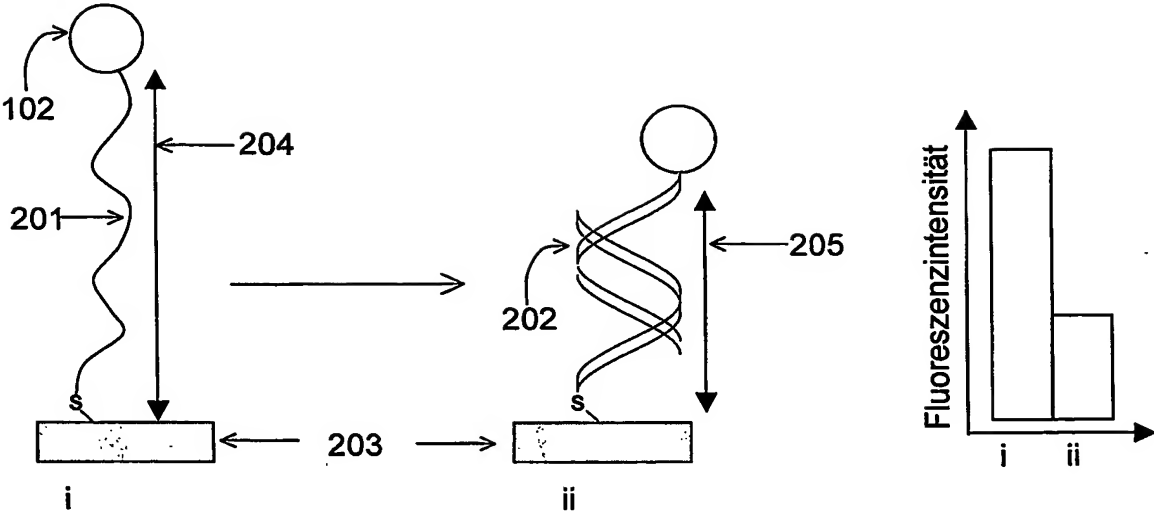
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei vor Schritt c) der Schritt

20 b₂) Zusatz von wenigstens einer weiteren Art von Nukleinsäure-Oligomer zu der Probe, wobei diese Art von Nukleinsäure-Oligomer in der in Schritt b) bereitgestellten Probe nicht enthalten ist und das Nukleinsäure-Oligomer eine Assoziationskonstante >0 zu einer in einem bestimmten Bereich T_n an die Oberfläche gebundenen Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren aufweist, wobei das Nukleinsäure-Oligomer in einer Menge zugegeben wird, dass nach Schritt c) n% der modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in dem Bereich T_n in assoziierter Form vorliegen

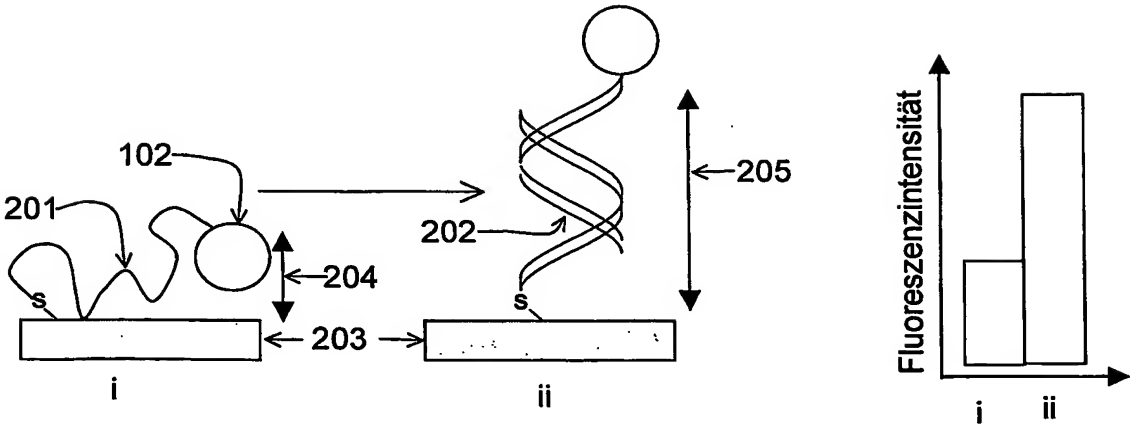
30 durchgeführt wird und in Schritt f) die in Schritt e) erhaltenen Werte mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_{100} erhaltenen Wert, mit dem in Schritt b₄) für den Bereich T_0 erhaltenen Wert, mit den in Schritt b₄) für die Bereiche T_n erhaltenen Werten und mit den in Schritt b₄) erhaltenen Referenzwerten verglichen werden.

35 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in Schritt d) eine Salzkonzentration zwischen 0,5 und 10 mol/l, insbesondere zwischen 1 und 10 mol/l eingestellt wird.

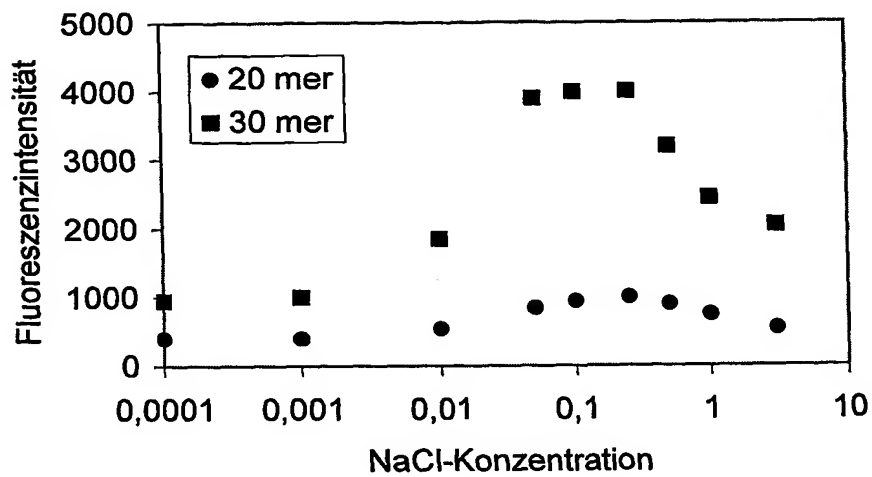
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei in Schritt d) eine Salzkonzentration zwischen 0,5 und 3 mol/l, insbesondere zwischen 2 und 3 mol/l eingestellt wird.
- 5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere 3 bis 70 Basen, bevorzugt 5 bis 60 Basen, besonders bevorzugt 10 bis 50 Basen, insbesondere bevorzugt 12 bis 40 Basen umfassen.
- 10 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Modifikation der Oberfläche in der Anbindung von ausschließlich Nukleinsäure-Oligomeren besteht.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Oberfläche zusätzlich durch Anbindung eines kurzkettigen Co-Adsorbats modifiziert ist, insbesondere eines Co-Adsorbats der Kettenlänge 1 bis 30, bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 20, besonders bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 10, insbesondere bevorzugt der Kettenlänge 1 bis 5.
- 20 11. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 10 umfassend eine modifizierte Oberfläche, wobei die Modifikation in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren besteht und wobei die Nukleinsäure-Oligomere durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor modifiziert sind.



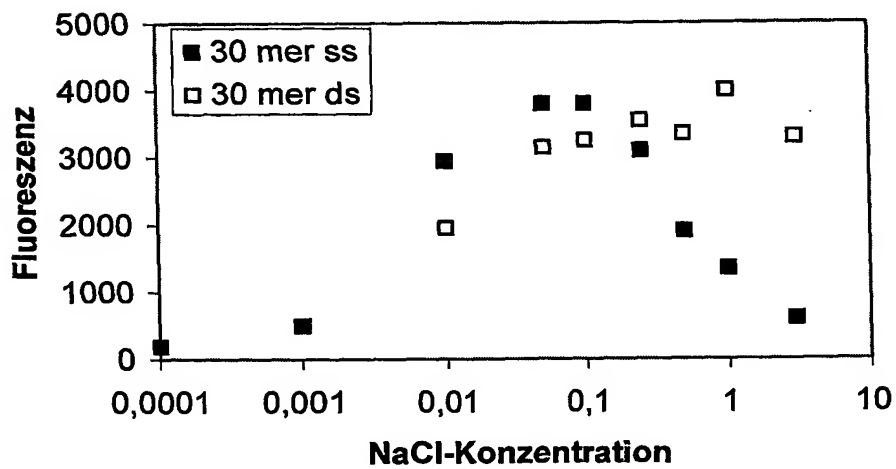
Figur 1A



Figur 1B



Figur 2A



Figur 2B

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Mai 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2003/040680 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2002/004148

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. November 2002 (08.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 55 055.3 9. November 2001 (09.11.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): FRIZ BIOCHEM GMBH [DE/DE]; Staffelseestr. 6,
81477 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HARTWICH, Ger-
hard [DE/DE]; Nibelungenstrasse 10, 80639 München

(DE). KRATZMÜLLER, Thomas [DE/DE]; Reut-
bergstrasse 20, 81371 München (DE). WIEDER, Herbert
[DE/DE]; Partnachstrasse 3, 81373 München (DE).

(74) Anwalt: KRITZENBERGER, Jürgen; Kritzenberger &
Zeuner, Hedwigstr. 9, 80636 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, CA, CN, CU,
HU, IL, IN, JP, MX, NO, PL, SI, US, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): eurasisches Patent (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

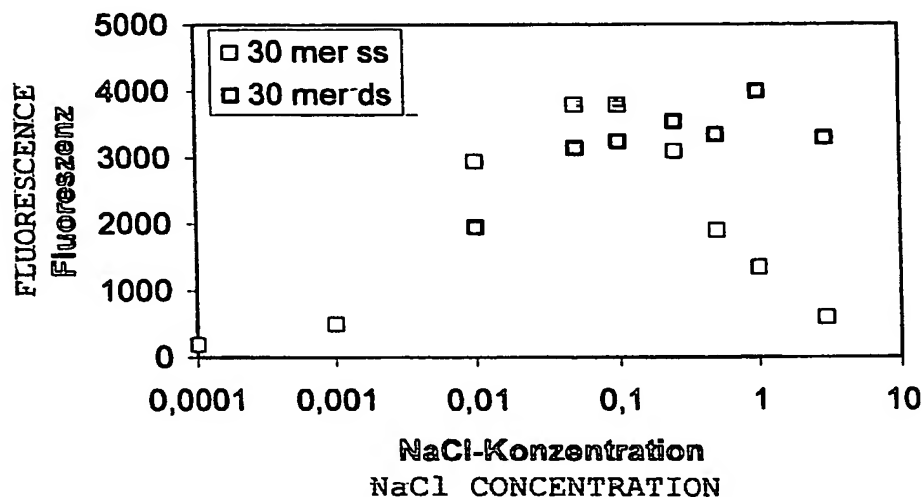
Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AU, BR, CA, CN, CU, HU,
IL, IN, JP, MX, NO, PL, SI, ZA, eurasisches Patent (AM,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FLUORESCENCE-QUENCHING USED TO DETECT NUCLEIC ACID OLIGOMER HYBRIDIZATION EVENTS
AT HIGH SALT CONCENTRATIONS

(54) Bezeichnung: FLUORESCENZ-QUENCHEN ZUR DETEKTION VON NUKLEINSÄURE-OLIGOMER-HYBRIDISIE-
RUNGSEREIGNISSEN BEI HOHEN SALZ-KONZENTRATIONEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting nucleic acid oligomer hybridization events by fluorescence quenching, which comprises as a first step the provision of a modified surface. The modification of the surface consists in the binding of at least one type of modified nucleic acid oligomers 201, wherein said nucleic acid oligomers 201 are modified by at least one type of fluorophore 102 bound to it. The further steps of the inventive method are: providing a sample that includes nucleic acid oligomers, contacting said sample with the modified surface, adjusting a defined salt concentration of greater than 0,5 mole/l in the solution surrounding the modified nucleic acid oligomer, detecting the fluorescence of the fluorophore and comparing the detected fluorescence intensity with reference values.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

29. Januar 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen durch Fluoreszenz-Quenchen, das als ersten Schritt das Bereitstellen einer modifizierten Oberfläche umfasst. Die Modifikation der Oberfläche besteht dabei in der Anbindung wenigstens einer Art von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren (201), wobei die Nukleinsäure-Oligomere (201) durch Anbindung wenigstens einer Art von Fluorophor (102) modifiziert sind. Die weiteren Schritte des erfindungsgemässen Verfahrens sind Bereitstellen einer Probe mit Nukleinsäure-Oligomeren, Inkontaktbringen der Probe mit der modifizierten Oberfläche, Einstellen einer definierten Salzkonzentration von grösser 0,5 mol/l in der die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere umgebenden Lösung, Detektion der Fluoreszenz des Fluorophors und Vergleich der detektierten Fluoreszenzintensität mit Referenzwerten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/04148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 312 906 B1 (CASS ANTHONY ET AL) 6 November 2001 (2001-11-06)	1-3,6-11
Y	Spalte 11, Zeile 66 - Spalte 12, Zeile 5; Beispiele 6-9; Ansprüche 1, 26; Figur 1	4,5
X	<p>--- DUBERTRET B ET AL: "Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 19, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 365-370, XP002224627 ISSN: 1087-0156 cited in the application Seite 366, Tabelle 1; Seite 369, letzte Spalte --- -/--</p>	1,2,6-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2003

Date of mailing of the international search report

27/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hennard, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No

PCT/DE 02/04148

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 805 348 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 24 August 2001 (2001-08-24) Seite 7, Zeilen 5-13; Ansprüche ---	11
Y	US 6 040 138 A (GINGERAS THOMAS R ET AL) 21 March 2000 (2000-03-21) Spalte 7, Zeilen 44-59; Spalte 16, Zeilen 1-31 ---	4,5
X,P	WO 02 18951 A (CALAME MICHEL ;DUBERTRET BENOIT (US); LIBCHABER ALBERT (US); UNIV) 7 March 2002 (2002-03-07) Beispiel 2; Figur 1B ---	1,6-11
A	ANONYMOUS: "SSC Buffer Concentration Saline-Sodium Citrate (SSC) buffer for ISH Procedures" INTERNET ARTICLE , 'Online! XP002248057 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.zymed.com/pdf/00-xxxx/00-8 400.pdf> abstract -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No

PCT/DE 02/04148

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6312906	B1	06-11-2001	AU 2965500 A WO 0042222 A2	01-08-2000 20-07-2000
FR 2805348	A	24-08-2001	FR 2805348 A1 AU 3574201 A CA 2399258 A1 EP 1266030 A2 WO 0163282 A2 US 2003165914 A1	24-08-2001 03-09-2001 30-08-2001 18-12-2002 30-08-2001 04-09-2003
US 6040138	A	21-03-2000	AT 231559 T AU 7073496 A CA 2232047 A1 DE 69625920 D1 EP 0853679 A1 JP 11512293 T WO 9710365 A1 US 6410229 B1 US 2003186296 A1 US 2002183933 A1 US 2002012940 A1	15-02-2003 01-04-1997 20-03-1997 27-02-2003 22-07-1998 26-10-1999 20-03-1997 25-06-2002 02-10-2003 05-12-2002 31-01-2002
WO 0218951	A	07-03-2002	AU 9323201 A WO 0218951 A2	13-03-2002 07-03-2002

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationalen Kennzeichen

PCT/DE 02/04148

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 312 906 B1 (CASS ANTHONY ET AL) 6. November 2001 (2001-11-06)	1-3,6-11
Y	Spalte 11, Zeile 66 - Spalte 12, Zeile 5; Beispiele 6-9; Ansprüche 1, 26; Figur 1	4,5
X	--- DUBERTRET B ET AL: "Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 19, Nr. 4, April 2001 (2001-04), Seiten 365-370, XP002224627 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Seite 366, Tabelle 1; Seite 369, letzte Spalte --- -/-	1,2,6-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hennard, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	FR 2 805 348 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 24. August 2001 (2001-08-24) Seite 7, Zeilen 5-13; Ansprüche ----	11
Y	US 6 040 138 A (GINGERAS THOMAS R ET AL) 21. März 2000 (2000-03-21) Spalte 7, Zeilen 44-59; Spalte 16, Zeilen 1-31 ----	4,5
X,P	WO 02 18951 A (CALAME MICHEL ;DUBERTRET BENOIT (US); LIBCHABER ALBERT (US); UNIV) 7. März 2002 (2002-03-07) Beispiel 2; Figur 1B ----	1,6-11
A	ANONYMOUS: "SSC Buffer Concentration Saline-Sodium Citrate (SSC) buffer for ISH Procedures" INTERNET ARTICLE , 'Online! XP002248057 Gefunden im Internet: <URL:http://www.zymed.com/pdf/00-xxxx/00-8400.pdf> Zusammenfassung -----	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der Patentfamilie gehören

Internationales Patentzeichen

PCT/DE 02/04148

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
US 6312906	B1	06-11-2001	AU	2965500 A		01-08-2000
			WO	0042222 A2		20-07-2000
FR 2805348	A	24-08-2001	FR	2805348 A1		24-08-2001
			AU	3574201 A		03-09-2001
			CA	2399258 A1		30-08-2001
			EP	1266030 A2		18-12-2002
			WO	0163282 A2		30-08-2001
			US	2003165914 A1		04-09-2003
US 6040138	A	21-03-2000	AT	231559 T		15-02-2003
			AU	7073496 A		01-04-1997
			CA	2232047 A1		20-03-1997
			DE	69625920 D1		27-02-2003
			EP	0853679 A1		22-07-1998
			JP	11512293 T		26-10-1999
			WO	9710365 A1		20-03-1997
			US	6410229 B1		25-06-2002
			US	2003186296 A1		02-10-2003
			US	2002183933 A1		05-12-2002
			US	2002012940 A1		31-01-2002
WO 0218951	A	07-03-2002	AU	9323201 A		13-03-2002
			WO	0218951 A2		07-03-2002